

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

20 AUG 2004



REC'D 17 APR 2003	
WIPO	PCT

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 08 188.3

**Anmeldetag:** 20. Februar 2002

**Anmelder/Inhaber:** amaxa GmbH, Köln/DE

**Bezeichnung:** Behälter mit zumindest einer Elektrode

**IPC:** C 12 M und C 12 N

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. März 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Hiebing

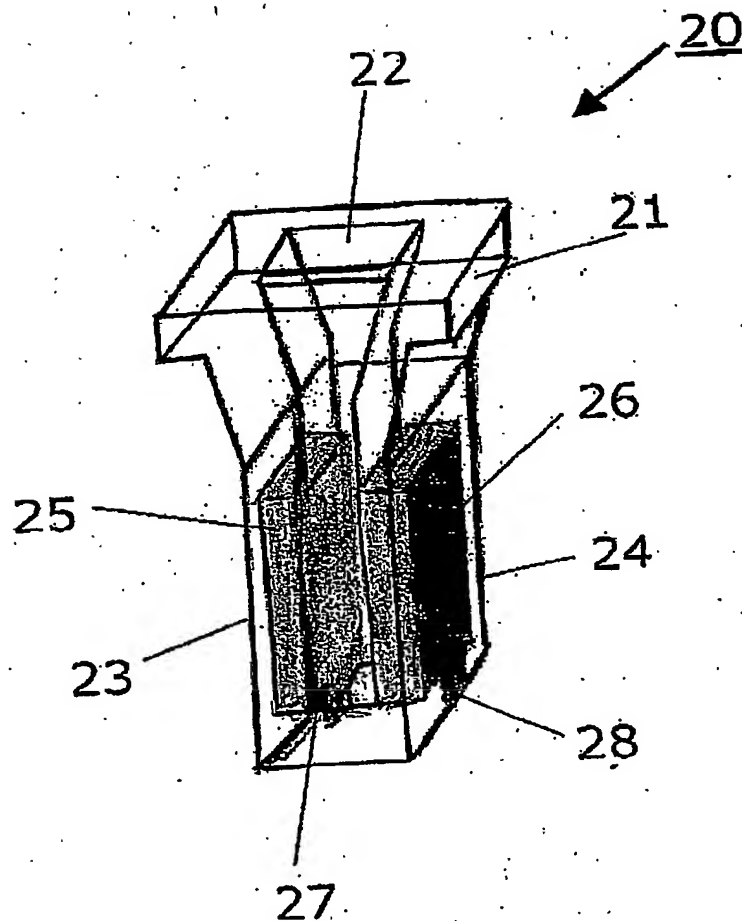


Anmelder: amaxa GmbH, Köln  
Vertreter: Patentanwalt Dr. Alvaro Remus  
Titel: Behälter mit mindestens einer Elektrode

### Zusammenfassung

- Die Erfindung betrifft einen Behälter 20 zur Aufnahme einer wässrigen Lösung, welcher zumindest teilweise von einer äußeren Begrenzung 21 gebildet ist, der einen Innenraum 22 zur Aufnahme der Lösung bildet, und welcher mindestens einen Bereich aufweist, der beim Anlegen einer elektrischen Spannung und einer anschließenden Entladung als Elektrode 25, 26 dient, wobei mindestens eine Elektrode 25, 26 aus einem leitfähigen Kunststoffmaterial besteht, das zumindest auf einem Kunststoff basiert, der mit mindestens einem leitfähigen Stoff dotiert ist. Hierdurch wurde ein Behälter 20 der eingangs genannten Art geschaffen, der einfach und kostengünstig herzustellen ist und darüber hinaus beispielsweise eine effiziente Transfektion von lebenden Zellen mittels Elektroporation oder eine effektive Elektrofusion ermöglicht. (Fig. 12)

Fig. 12



Anmelder: amaxa GmbH, Köln  
Vertreter: Patentanwalt Dr. Alvaro Remus  
Aktz.: A02110DE

## Behälter mit zumindest einer Elektrode

Die Erfindung betrifft einen Behälter zur Aufnahme einer wässrigen Lösung, und insbesondere von Zellen, Zellderivaten, subzellulären Partikeln und/oder Vesikeln, welcher zumindest teilweise von einer äußeren Begrenzung gebildet ist, die einen Innenraum zur Aufnahme der Lösung bildet, und welcher mindestens einen Bereich aufweist, der beim Anlegen einer elektrischen Spannung und einer anschließenden Entladung als Elektrode dient.

10

Das Einbringen biologisch aktiver Moleküle, wie beispielsweise DNA, RNA oder Proteine, in lebende Zellen stellt ein wichtiges Instrument zur Untersuchung biologischer Funktionen dieser Moleküle dar. Eine bevorzugte Methode zum Einbringen von Fremdmolekülen in die Zellen ist dabei die Elektroporation, welche im Gegensatz zu chemischen Methoden geringere unerwünschte Veränderungen der biologischen Struktur und Funktionen der Zielzelle bewirkt. Bei der Elektroporation werden die Fremdmoleküle aus einer wässrigen Lösung, vorzugsweise einer an die Zellen angepassten Pufferlösung oder einem Zellkulturmedium, durch einen kurzzeitigen Stromfluss, d.h. den Puls eines sich entladenden Kondensators, in die Zellen eingebracht, wobei durch die Wirkung der kurzen elektrischen Pulse die Zellmembran für die Fremdmoleküle durchlässig gemacht wird. Die Lösung bzw. Zellsuspension befindet sich dabei häufig in einer sogenannten Küvette, d.h. einem schmalen, nach oben offenen Gefäß, die in der Nähe ihres Bodens zwei gegenüberliegende, parallele Elektroden in den Seitenwänden aufweist, welche zum Anlegen der elektrischen Spannung dienen. Durch die kurzzeitig entstehenden „Poren“ in der Zellmembran gelangen die biologisch aktiven Moleküle zunächst in das Zytoplasma, in dem sie ggf. bereits ihre zu untersuchende Funktion ausüben können, und daraufhin unter bestimmten Bedingungen auch in den Zellkern. Insbesondere beim Einbringen von DNA in tierische Zellen, der sogenannten Transfektion, entstehen aber häufig aufgrund der Labilität der Zellen besondere Probleme bei der Elektroporation, da die

Überlebensrate der Zellen als wichtiger Parameter die Effizienz der Transfektion beeinflusst.

Durch das kurzzeitige Anlegen eines starken elektrischen Feldes, d.h. eines  
5 kurzen Pulses mit hoher Stromdichte, können darüber hinaus auch Zellen, Zellderivate, subzelluläre Partikel und/oder Vesikel fusioniert werden. Bei dieser sogenannten Elektrofusion werden die Zellen beispielsweise zunächst durch ein inhomogenes elektrisches Wechselfeld in engen Membrankontakt gebracht. Durch das anschließende Anlegen eines elektrischen Feldpulses kommt es  
10 dann zur Interaktion von Membranteilen, die schließlich zur Fusion führt. Für die Elektrofusion können dabei vergleichbare apparative Vorrichtungen verwendet werden, wie für die Elektroporation.

Behälter der eingangs genannten Art sind bekannt und werden vor allem bei  
15 der Elektroporation oder Elektrofusion in Form von Küvetten mit eingelegten Elektroden aus Metall eingesetzt. Die für diesen Zweck verwendeten Behälter sind meist schmale, nach unten geschlossene und nach oben offene Gefäße, deren Innenraum aus jeweils zwei Paaren parallel und gegenüberliegend angeordneter Seitenwände gebildet wird. Der Innenraum dient dabei der  
20 Aufnahme der Zellsuspension, d.h. in der Regel einer wässrigen Pufferlösung oder eines Zellkulturmediums, in dem die zu behandelnden Zellen suspendiert sind. Zum Anlegen einer elektrischen Spannung weisen solche Küvetten zumeist im unteren Bereich eines Paares gegenüberliegender Seitenwände ein Elektrodenpaar auf. Bei einer elektrischen Entladung fließt zwischen den  
25 beiden Elektroden ein elektrischer Strom durch die Zellsuspension, der einen Transport der Nukleinsäuren oder anderer Moleküle in die Zellen bewirkt oder je nach den gewählten Bedingungen zur Zellfusion führt. Die Elektroden bestehen dabei zumeist aus Metall, wobei häufig Aluminium verwendet wird. Diese bekannten, handelsüblichen Küvetten haben aber den Nachteil, dass bei  
30 der elektrischen Entladung Metall-Ionen in die Pufferlösung abgegeben werden, die in geringer Konzentration zu einer unerwünschten Stimulierung der Zellen führen können und in höherer Konzentration toxisch auf die Zellen wirken. So konnte beispielsweise bei der Verwendung von Aluminium-Küvetten ein

- negativer Effekt durch die Freisetzung von  $Al^{3+}$ -Ionen nachgewiesen werden (Loomis-Husselbee et al., Biochem J 1991, 277 (Pt 3), 883 – 885). Darüber hinaus kann es bei der Verwendung von Küvetten mit Metallelektroden zur Bildung von unerwünschten Präzipitaten kommen, die ebenfalls aufgrund der Freisetzung von Metall-Ionen aus den Elektroden gebildet werden. Dabei kann es sich möglicherweise um Metallhydroxyde oder Komplexe von Metall-Ionen mit biologischen Makromolekülen aus der Pufferlösung handeln (Stapulionis, Bioelectrochem Bioenerg 1999, 48(1), 249 – 254). Aluminium-Küvetten haben schließlich auch den Nachteil, dass der Widerstand in der Küvette während der Entladung absinkt, vermutlich weil eine Schicht aus oxidiertem Aluminium mit höherem Widerstand durch den Stromfluss von der Elektrode abgelöst wird. Küvetten mit Metallelektroden sind zudem schwierig herzustellen und daher sehr teuer.
- Aus der US 6,001,617 ist eine Vorrichtung zur Kultivierung von Zellen bekannt, die gleichzeitig zur Elektroporation oder Elektrofusion von Zellen verwendet werden kann. Die Vorrichtung besteht aus einem runden Behälter, der einen optisch transparenten Boden aufweist, auf dem eine Zellschicht anhaften und wachsen kann. Der Boden des Behälters kann dabei aus einem optisch transparenten, nicht leitfähigen Material bestehen, das mit einem elektrisch leitfähigen Material beschichtet ist, oder vollständig aus einem optisch transparenten und elektrisch leitfähigen Material hergestellt sein. Der elektrisch leitfähige Boden wird über eine im Wandbereich umlaufende, bandförmige Elektrode aus Metall kontaktiert. Als Gegenelektrode ist ebenfalls ein ringförmig umlaufendes Band vorgesehen. Diese bekannte Vorrichtung hat zunächst den Nachteil, dass sie vor allem für die Elektroporation von adhärennten Zellen vorgesehen und geeignet ist. Eine Transfektion von suspendierten Zellen ist hiermit nur sehr eingeschränkt und mit geringer Effizienz möglich. Aufgrund der ringförmigen, umlaufenden Kontaktierung der Bodenelektrode und der ebenfalls im Wandbereich umlaufenden Gegenelektrode kann kein homogenes elektrisches Feld erzeugt werden, so dass keine gleichmäßige Transfektion aller Zellen möglich ist. Dieser Effekt wird noch dadurch verstärkt, dass die verwendeten intrinsisch leitenden Kunststoffe als dünne Beschichtung einen

hohen Widerstand aufweisen, so dass die im Zentrum der Bodenfläche anhaftenden Zellen nur mit sehr geringer Effizienz transfiziert werden können. Aufgrund seines komplexen Aufbaus und der Tatsache, dass die verwendeten intrinsisch leitenden Kunststoffe nicht spritzfähig sind, ist der bekannte Behälter  
5 darüber hinaus auch sehr teuer in der Herstellung.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, einen Behälter der eingangs genannten Art zu schaffen, welcher die bestehenden Nachteile vermeidet, einfach und kostengünstig herzustellen ist und darüber hinaus eine effiziente  
10 Behandlung von Zellen, Zellerivaten, subzellulären Partikeln und/oder Vesikeln mit elektrischem Strom ermöglicht.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, dass mindestens eine Elektrode aus einem leitfähigen Kunststoffmaterial besteht, das zumindest auf  
15 einem Kunststoff basiert, der mit mindestens einem leitfähigen Stoff dotiert ist. Durch die Verwendung eines leitfähigen Kunststoffmaterials aus dotiertem Kunststoff wird eine Freisetzung von Metall-Ionen vermieden, so dass toxische Effekte beispielsweise auf lebende Zellen, wie beispielsweise bei der Freisetzung von  $Al^{3+}$ -Ionen, vermieden werden. Hierdurch kann auch die  
20 medizinische Kompatibilität der entstehenden Produkte erhöht werden, so dass beispielsweise die mögliche Verwendung von transfizierten primären Zellen zur ex vivo - Gentherapie positiv beeinflusst wird. Durch die Dotierung des Kunststoffs mit leitfähigen Stoffen konnte bei der Entladung ein Stromfluss zwischen den beiden Elektroden erreicht werden, der dem Stromfluss bei  
25 herkömmlichen Küvetten mit Metallelektroden entspricht. Es hat sich ferner überraschenderweise herausgestellt, dass bei den verwendeten dotierten Kunststoffen bei der Elektroporation in Bezug auf die Transfektionseffizienzen verbesserte Ergebnisse gegenüber der Verwendung von beispielsweise Küvetten mit Aluminiumelektroden erzielt werden können. Dabei ist durch die  
30 Vermeidung der toxischen Effekte durch das Freisetzen von Metall-Ionen das Verhältnis von Transfektionseffizienz zu Mortalität der Zellen deutlich verbessert. Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Behälter liegt darin, dass sich bei der elektrischen Entladung keine Präzipitate in der Lösung bilden,

die an den Zellen anhaften und bei der weiteren Untersuchung bzw. Verwendung der transfizierten Zellen störend wirken können. Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Behälter liegt offenbar auch darin, dass die verwendeten Elektroden aus dotiertem Kunststoff weniger von der verwendeten Pufferlösung beeinflusst werden. Es hat sich nämlich herausgestellt, dass sich bei der Verwendung von Aluminium-Küvetten bei der Verwendung von phosphathaltigen Puffern ohne Chlorid im Verlauf der Entladung ein sehr hoher Widerstand an der Elektrodenoberfläche aufbaut, der bei gleichem Anfangsstrom zu einem drastischen Abfallen des Stromflusses führt. Überraschenderweise ist dies bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Behälter bzw. Elektroden nicht der Fall. Die erfindungsgemäßen Behälter verhalten sich also nur entsprechend der Leitfähigkeit der Lösung und werden ansonsten von den verwendeten Puffern nicht nachteilig beeinflusst. Da dotierte Kunststoffe im Gegensatz zu intrinsisch leitenden Kunststoffen spritzfähig sind, können die erfindungsgemäßen Behälter im 2-Komponenten-Spritzguss in einer Form gespritzt werden, so dass sie sehr einfach und kostengünstig herzustellen sind.

Es hat sich im Hinblick auf die Leitfähigkeit des Kunststoffmaterials als besonders vorteilhaft herausgestellt, wenn die Dotierung aus Kohlefasern, Graphit, Ruß, Kohlenstoffnanotubes und/oder einem intrinsisch leitenden Kunststoff besteht. Die Dotierung sollte dabei in dem Kunststoff in einer Konzentration zwischen insgesamt 10 und 80 Gew.-% vorliegen. Unterhalb von 10 % ist die Leitfähigkeit des Kunststoffmaterials nicht mehr ausreichend, während oberhalb von 80 % die Spritzbarkeit des Kunststoffs zu stark beeinträchtigt wird. Für die Verwendung der erfindungsgemäßen Behälter bei der Elektroporation oder Elektrofusion von Zellen, Zellerivaten, subzellulären Partikeln und/oder Vesikeln hat sich in Bezug auf die Leitfähigkeit ein Anteil der Dotierung von insgesamt 20 – 60 Gew.-% als besonders vorteilhaft erwiesen.

In Bezug auf die Spritzfähigkeit des Kunststoffmaterials hat es sich als besonders vorteilhaft herausgestellt, wenn der Kunststoff Polycarbonat, Polyetheretherketon, Polypropylen, Polyamid, Polyphenylensulfid oder ein



Gemisch dieser Polymere ist oder zumindest auf einem oder mehreren dieser Polymere basiert und/oder wenn der Kunststoff ein intrinsisch leitender Kunststoff ist.

- 5 Falls der Kunststoff seinerseits mit einem intrinsisch leitenden Kunststoff dotiert ist und/oder aus intrinsisch leitendem Kunststoff besteht, ist in vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung vorgesehen, dass der intrinsisch leitende Kunststoff ein Polyanilin, Polyacethylen, Poly-para-phenylen, Poly-para-phenylensulfid, Polypyrrol, Polythiophen, Polypropylen oder ähnliches ist oder
- 10 zumindest auf einem oder mehreren dieser Polymere basiert.

- In weiterer vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die äußere Begrenzung aus Kunststoff, vorzugsweise transparentem Kunststoff, gebildet ist, da somit eine einfache und kostengünstige Herstellung des
- 15 gesamten Behälters im Spritzgussverfahren möglich ist. Dabei kann es vorteilhaft sein, dass die Begrenzung aus dem gleichen Kunststoff besteht, auf dem auch die zumindest eine Elektrode basiert. Bei dieser Ausgestaltung können sich Vorteile bei der Verarbeitung des Kunststoffmaterials im 2-Komponenten-Spritzguß ergeben. Hierdurch wird einerseits die Herstellung
- 20 vereinfacht und andererseits eine Reduzierung der Herstellungskosten erreicht. Für besondere Anwendungen kann die äußere Begrenzung aber auch aus anderen Materialien bestehen.

- In besonders vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung ist ferner vorgesehen,
- 25 dass die zumindest eine Elektrode in die äußere Begrenzung integriert ist, so dass der Behälter in einer Form gespritzt werden kann.

- In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der Behälter zumindest zwei Elektroden aufweist, die aus dem gleichen Material
- 30 bestehen. Bei den meisten Anwendungen werden Behälter bzw. Küvetten verwendet, die zwei gegenüberliegende, parallel angeordnete Elektroden aus identischem Material aufweisen. Diese beiden Elektroden werden auf geeignete Weise kontaktiert und so an eine an die jeweiligen Anforderungen angepasste

Spannungsquelle angeschlossen. In besonderen Fällen kann es aber auch von Vorteil sein, wenn zumindest zwei Elektroden aus unterschiedlichen Materialien bestehen. Dabei kann beispielsweise die Anode oder die Katode aus dem dotierten Kunststoff bestehen, während die jeweilige Gegenelektrode aus einem anderen Material, beispielsweise Edelstahl oder einem intrinsisch leitenden Kunststoff, besteht.

Als besonders vorteilhaft für die Transfektion von lebenden Zellen haben sich die Behälter mit Elektroden aus einem leitfähigen Kunststoffmaterial gemäß einem der Ansprüche 11 bis 15 erwiesen. Diese Behälter vereinen eine hohe Leitfähigkeit mit leichter Verarbeitbarkeit des Elektrodenmaterials.

Die erfindungsgemäßen Behälter eignen sich in besonders vorteilhafter Weise auch zur Verwendung in Form von Behälteranordnungen bestehend aus wenigstens 2, vorzugsweise 6, 12, 24, 48, 96 oder mehr, zu einer Einheit verbundenen Behältern, d.h. sogenannten „multi-wells“.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung liegt darin, dass die erfindungsgemäßen Behälter oder Behälteranordnungen in einem Verfahren hergestellt werden können, bei dem der Behälter oder die Behälteranordnung im 2-Komponenten-Spritzguß hergestellt werden kann, wobei zunächst die äußere Begrenzung mit mindestens einem ausgesparten Fenster gespritzt wird und anschließend zumindest in das mindestens eine Fenster das leitfähige Kunststoffmaterial aus dotiertem Kunststoff eingespritzt wird, oder wobei zunächst die mindestens eine Elektrode aus dem dotierten Kunststoff gespritzt wird und anschließend um die mindestens eine Elektrode herum die äußere Begrenzung gespritzt wird. Im Gegensatz zur Herstellung von Behältern bzw. Küvetten mit Metall-Elektroden, bei denen die Elektroden vor oder nach dem Spritzen der Behälter manuell oder maschinell in die gespritzten Rahmen bzw. Formen eingelegt werden müssen, ist erfindungsgemäß ein sehr einfaches und kostengünstiges Herstellungsverfahren möglich. Die erfindungsgemäßen Behälter oder Behälteranordnungen können in einer Form in zwei Schritten gespritzt werden, so dass sie hinsichtlich der Herstellungskosten deutlich unterhalb der

herkömmlichen Kosten für Küvetten für die Elektroporation oder Elektrofusion liegen.

Die erfindungsgemäßen Behälter oder Behälteranordnungen eignen sich in  
5 besonders vorteilhafter Weise für die Verwendung in Verfahren zur Behandlung  
von Zellen, Zellderivaten, subzellulären Partikeln und/oder Vesikeln mit  
elektrischem Strom, insbesondere zur Elektroporation oder Elektrofusion, bei  
denen die Zellen, Zellderivate, subzellulären Partikel und/oder Vesikel zunächst  
10 in den Innenraum zumindest eines Behälters oder zumindest eines Behälters  
einer Behälteranordnung überführt werden, wobei der Behälter mindestens eine  
Elektrode aus dem dotierten Kunststoff aufweist, sowie zumindest eine weitere  
Elektrode vorgesehen ist, und dann eine elektrische Spannung an die  
Elektroden angelegt und ein Stromfluss im Innenraum des Behälters erzeugt  
15 wird. Dabei kann der elektrische Strom eine Stromdichte von bis zu  $120 \text{ A/cm}^2$ ,  
vorzugsweise  $80 \text{ A/cm}^2$ , erreichen. Die Zellen, Zellderivate, subzellulären  
Partikel und/oder Vesikel können dabei in suspendierter Form, adhärent oder in  
sonstiger immobilisierter Form eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Behälter oder Behälteranordnungen eignen sich also  
20 neben anderen denkbaren Anwendungen beispielsweise für die  
Elektroporation, d.h. Verfahren zum Einbringen von biologisch aktiven  
Molekülen in lebende Zellen mittels elektrischen Stroms, wobei biologisch  
aktive Moleküle, insbesondere Nukleinsäuren, in der Lösung gelöst sind und  
beispielsweise durch einen Spannungspuls mit einer Feldstärke von 2 bis 10  
25  $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$  und einer Dauer von 10 bis  $200 \mu\text{s}$  ein Einbringen dieser biologisch  
aktiven Moleküle in die Zellen erreicht wird. Auf diesen Spannungspuls kann bei  
besonderen Anwendungen beispielsweise ein ohne Unterbrechung folgender  
Stromfluss mit einer Stromdichte von 2 bis  $14 \text{ A/cm}^2$ , vorzugsweise  $5 \text{ A/cm}^2$ ,  
und einer Dauer von 1 – 100 ms, vorzugsweise 50 ms, folgen. Die Zellen  
30 können dabei beispielsweise in Suspension oder in Form einer adhären-  
ten Zellschicht verwendet werden.

- Die erfindungsgemäßen Behälter oder Behälteranordnungen eignen sich darüber hinaus beispielsweise auch für die Elektrofusion, d.h. Verfahren zur Fusion von Zellen, Zellderivaten, subzellulären Partikeln und/oder Vesikeln mittels elektrischen Stroms, bei dem beispielsweise die Zellen, Zellderivate, subzellulären Partikel und/oder Vesikel zunächst in zweckmäßiger Dichte in einer wässrigen Lösung suspendiert werden, die Suspension anschließend in zumindest einen Behälter oder eine Behälteranordnung gemäß der vorliegenden Erfindung überführt wird, und schließlich eine elektrische Spannung an die Elektroden angelegt und ein Stromfluss durch die Suspension erzeugt wird. Alternativ können beispielsweise auch adhärente Zellen, Zellderivate, subzelluläre Partikel und/oder Vesikel oder aber auch beispielsweise adhärente Zellen mit suspendierten Zellen, Zellderivaten, subzellulären Partikeln oder Vesikeln fusioniert werden.
- Die Erfindung wird im weiteren anhand der Figuren näher erläutert.

Es zeigt

- Figur 1 eine perspektivische Darstellung einer Versuchsanordnung zur Demonstration der vorliegenden Erfindung,
- Figur 2 Stromverläufe von elektrischen Entladungen bei Verwendung von erfindungsgemäßen Elektroden aus Polycarbonat mit 20 % Kohlefasern und 15 % Graphit (PC+CF+Gr mit einer Elektrodendicke von 1,65 mm) im Vergleich zur Verwendung von Aluminium-Elektroden jeweils mit zwei unterschiedlichen Pufferlösungen (Lösung A: 100 mM Natriumphosphat, pH 7,1 und 25 mM Kaliumchlorid; Lösung B: 140 mM Natriumphosphat, pH 7,1; Ordinate: Strom, 1 A pro Kästchen; Abszisse: Zeit, 10 ms pro Kästchen),

Figur 3 eine perspektivische Darstellung einer gegenüber Figur 1 abgewandelten Versuchsanordnung mit eingelegten Kupferdrähten.

5 Figur 4 Stromverläufe von elektrischen Entladungen bei Verwendung von Elektroden aus Polycarbonat mit 20 % Kohlefasern (Elektrodenstärke 2 mm) für eine Versuchsanordnung gemäß Figur 1 (a) und Figur 3 (b). Ordinate: Strom, 1 A pro Kästchen und Abszisse: Zeit, 10 ms pro Kästchen,

10 Figur 5 Diagramme einer durchfluss-zytometrischen Analyse transfizierter CHO-Zellen (Chinesische Hamster-Ovarzellen) bei Verwendung unterschiedlicher erfindungsgemäßer Kunststoff-Elektroden im Vergleich zu Aluminium-Elektroden, a) Anzahl transfizierter Zellen pro 25000 Zellen, b) Prozentualer Anteil von mit Propidiumjodid angefärbten toten Zellen, PC/CF/Gr = Polycarbonat + 20 % Kohlefasern + 15 % Graphit mit einer Elektrodenstärke von 1,65 mm, PEEK/CF = Polyetheretherketon + 40 % Kohlefasern mit einer Elektrodenstärke von 1 mm,

20 Figur 6 Diagramme einer durchfluss-zytometrischen Analyse transfizierter HL-60-Zellen (Humane Lymphomzellen) bei Verwendung unterschiedlicher erfindungsgemäßer Kunststoff-Elektroden im Vergleich zu Aluminium-Elektroden, a) Anzahl transfizierter Zellen pro 15000 Zellen, b) Prozentualer Anteil von mit Propidiumjodid angefärbten toten Zellen, PC/CF/Gr = Polycarbonat + 20 % Kohlefasern + 15 % Graphit mit einer Elektrodenstärke von 1,65 mm, PEEK/CF = Polyetheretherketon + 40 % Kohlefasern mit einer Elektrodenstärke von 1 mm,

30 Figur 7 Diagramme einer durchfluss-zytometrischen Analyse transfizierter Jurkat-Zellen (Humane T-Zelllinie) bei Verwendung erfindungsgemäßer Kunststoff-Elektroden im Vergleich zu Aluminium-

Elektroden, a) Anzahl transfizierter Zellen pro 25000 Zellen, b) Prozentualer Anteil von mit Propidiumjodid angefärbten toten Zellen, PA/CF = Polyamid 66 + 30 % Kohlefasern mit einer Elektrodendicke von 1 mm;

5

Figur 8

Diagramme einer durchfluss-zytometrischen Analyse transfizierter HUVEC-Zellen (Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen) bei Verwendung erfindungsgemäßer Kunststoff-Elektroden im Vergleich zu Aluminium-Elektroden, a) Anzahl transfizierter Zellen pro 15000 Zellen, b) Prozentualer Anteil von mit Propidiumjodid angefärbten toten Zellen, PPS/CF = Polyphenylensulfid + 40 % Kohlefasern,

10

Figur 9

mikroskopische Aufnahmen von CHO-Zellkulturen (CHO = Chinesische Hamster-Ovarzellen) 2 Tage nach einer Elektroporation mit a) Aluminium-Elektroden und b) Elektroden aus Polyphenylensulfid + 40 % Kohlefasern,

15

Figur 10

Diagramme einer durchfluss-zytometrischen Analyse von HUVEC-Zellen (Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen) nach Inkubation in unterschiedlich behandelten Lösungen, a) Anzahl der mit Propidiumjodid gefärbten toten Zellen, b) Anzahl der mit Carboxyfluoresceindiaceetat-Succinimidylester (CFDA-SE) gefärbten lebenden Zellen, PA/CF = Polyamid 66 + 30 % Kohlefasern mit einer Elektrodendicke von 1 mm, PC/CF/Gr = Polycarbonat + 20 % Kohlefasern + 15 % Graphit mit einer Elektrodendicke von 1,65 mm,

20

25

Figur 11

Diagramme einer durchfluss-zytometrischen Analyse von CHO-Zellen (Chinesische Hamster-Ovarzellen) nach Inkubation in unterschiedlich behandelten Lösungen, a) Anzahl der mit Propidiumjodid gefärbten toten Zellen, b) Anzahl der mit Carboxyfluoresceindiaceetat-Succinimidylester (CFDA-SE)

30

gefärbten lebenden Zellen, PP/CF = Polypropylen + 20 % Kohlefasern mit einer Elektrodendicke von 1 mm, PPS/CF = Polyphenylensulfid + 40 % Kohlefasern, PA/CF = Polyamid 66 + 30 % Kohlefasern mit einer Elektrodendicke von 1 mm und

5

Figur 12 eine perspektivische Darstellung einer möglichen Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Behälters.

- Figur 1 zeigt eine perspektivische Darstellung einer Versuchsanordnung 1 zur
- 10 Demonstration der vorliegenden Erfindung bzw. zum Testen der erfindungsgemäßen Behälter. Die Versuchsanordnung 1 entspricht dem Aufbau der erfindungsgemäßen Behälter und besteht aus einer Abstandhalterplatte 2 und zwei beidseitig an die Abstandhalterplatte 2 angepressten Elektroden 3, 4. Bei der Abstandhalterplatte 2 handelt es sich um eine 2 mm dicke Platte aus
- 15 Teflon, die einen u-förmigen Ausschnitt 5 aufweist. Die Elektroden 3, 4 bestehen aus einem Kunststoff, der mit mindestens einem leitfähigen Stoff dotiert ist. Bei dem Kunststoff kann es sich beispielsweise um Polycarbonat, Polyetheretherketon, Polypropylen, Polyamid, Polyphenylensulfid oder ein Gemisch dieser Polymere und/oder einen intrinsisch leitenden Kunststoff
- 20 handeln. Die 3 Schichten, bestehend aus der Abstandhalterplatte 2 und den beiden Elektroden 3, 4, werden zu beiden Seiten mittels der Kupferplatten 6, 7 sandwichartig zusammengepresst. Die Kupferplatten 6, 7 werden zu diesem Zweck mittels der Gewindeabschnitte 8, 9 einer schraubstockartigen Vorrichtung (nicht dargestellt) aufeinander zubewegt. Wenn die genannten
- 25 Schichten zusammengepresst sind, entsteht im Bereich des Ausschnitts 5 ein Innenraum 10, dessen Volumen der Aufnahme der Lösung bzw. Zellen dient. Der Innenraum 10 kann im dargestellten Beispiel ein Volumen von 100 µl aufnehmen. Der Innenraum 10 wird ferner nach unten und zu zwei Seiten durch die Innenkanten 11 der Abstandhalterplatte 2 und an den beiden verbleibenden
- 30 Seiten durch die Elektroden 3, 4 gebildet. Die Kupferplatten 6, 7 stehen über Drähte in elektrischen Kontakt mit den Federkontakten eines handelsüblichen Elektroporationsgerätes, d.h. einer Spannungsquelle. Die Elektroden 3, 4 stehen ihrerseits über ihre gesamte äußere Oberfläche unmittelbar mit den

Kupferplatten in Kontakt, so dass eine optimale elektrische Kontaktierung gewährleistet ist. Beim Anlegen eines Spannungspulses zwischen den Kupferplatten 6, 7 fließt also bei der dargestellten Versuchsanordnung 1 ein Strom zwischen den Elektroden 3, 4 durch den mit der Lösung bzw. Zellsuspension gefüllten Innenraum 10.

Figur 2 zeigt die Stromverläufe von elektrischen Entladungen bei Verwendung von erfindungsgemäßen Elektroden aus Polycarbonat mit 20 % Kohlefasern und 15 % Graphit (PC + CF + Gr) im Vergleich zur Verwendung von Aluminium- Elektroden. Es wurde dabei der Stromfluss durch zwei unterschiedliche Pufferlösungen gemessen (Lösung A: 100 mM Natriumphosphat, pH 7,1 und 25 mM Kaliumchlorid; Lösung B: 140 mM Natriumphosphat, pH 7,1). Es wurde jeweils ein erster Spannungspuls von 1000 Volt und 40  $\mu$ s Dauer gesetzt, auf den ohne Unterbrechung ein zweiter Puls mit einer Anfangsspannung ( $U_{\text{Anfang}}$ ) von 90 V und einer Ladung von 75 mC folgte. Gezeigt ist hier jeweils der Stromverlauf des zweiten Pulses. Es zeigte sich dabei überraschenderweise, dass unter gleichen Bedingungen mit den erfindungsgemäßen Kunststoffelektroden größenordnungsmäßig ein ähnlicher Stromfluss erzielt werden kann, wie mit den handelsüblichen Aluminium-Elektroden (Vergleiche a und c). Die dotierten Kunststoffe eignen sich also besonders zum kurzzeitigen Leiten hoher Stromdichten. Bei der Verwendung eines Phosphatpuffers ohne Chlorid (Lösung B) zeigt sich im Gegensatz zur Verwendung eines chloridhaltigen Phosphatpuffers (Lösung A), dass sich bei Aluminium-Elektroden im Verlauf der Entladung ein sehr hoher Widerstand an der Elektrodenoberfläche aufbaut, der bei gleichem Anfangsstrom zu einem drastischem Abfall des Stromflusses führt (b). Bei der Verwendung von dotierten Kunststoffen tritt dieser negative Effekt nicht ein (d), so dass die erfindungsgemäßen Behälter bzw. Elektroden, im Gegensatz zu den herkömmlichen Küvetten mit Aluminium-Elektroden auch für die Verwendung von Phosphatpuffern ohne Chlorid geeignet sind. Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Behälter ist man folglich in der Wahl der Pufferlösung weniger eingeschränkt als bei der Verwendung herkömmlicher Behälter.



Figur 3 zeigt eine perspektivische Darstellung einer gegenüber der in Figur 1, dargestellten Versuchsanordnung 1 abgewandelten Versuchsanordnung 12. Die Versuchsanordnung 1 gemäß Figur 1 zeigt einen Aufbau, bei dem die Elektroden 3, 4 nach außen von den Kupferplatten 6, 7 großflächig mit relativ großem Druck kontaktiert werden. Da die Kontaktierung der Elektrodenaußenseiten beispielsweise in einer herkömmlichen Elektroporationsapparatur nicht auf so großer Fläche und nicht mit so hohem Druck erfolgt, wurden bei der Versuchsanordnung 12 die Kontaktflächen zu den Elektroden kleinflächiger gestaltet. Diese Anordnung entspricht daher eher einer Kontaktierung durch Federkontakte und somit den tatsächlichen, in der Praxis vorliegenden Verhältnissen. Zu diesem Zweck wurden zwischen den Elektroden 3, 4 und den jeweils benachbarten Kupferplatten 8, 7 runde, v-förmig gebogene Kupferdrähte 13, 14 mit einem Durchmesser von ca. 1,5 mm gelegt. Figur 4 zeigt im Folgenden im Vergleich die Stromverläufe mit den Versuchsanordnungen gemäß Figur 1 und 3.

Figur 4 zeigt die Stromverläufe von elektrischen Entladungen bei Verwendung von Elektroden aus Polycarbonat mit 20 % Kohlefasern jeweils für die Versuchsanordnung 1 gemäß Figur 1 (a) und die Versuchsanordnung 12 gemäß Figur 3 (b). Gezeigt sind jeweils die Stromverläufe des zweiten Pulses (1. Puls: 100 V, 40  $\mu$ s; 2. Puls:  $U_{\text{Anfang}} = 90$  V, 75 mC). Das gleichförmige Ergebnis zeigt, dass das elektrische Potential an der Elektrodeninnenseite offenbar gleichmäßig verteilt ist und die Kontaktierungsfläche folglich keinen limitierenden Faktor bezüglich der Leitfähigkeit darstellt.

25

Figur 5 zeigt Diagramme einer durchfluss-zytometrischen Analyse transfizierter CHO-Zellen. Um die Funktionalität der erfindungsgemäßen Behälter biologisch zu überprüfen, wurden Transfektionsversuche unter Verwendung der unter Figur 1 beschriebenen Versuchsanordnung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden CHO-Zellen in 100  $\mu$ l einer geeigneten Pufferlösung, beispielsweise PBS (phosphat buffered saline) unter Zugabe von 5  $\mu$ g des Expressions-Plasmids pH-2K<sup>k</sup> (DNA-Vektor, der für die schwere Kette eines MHC Klasse I Proteins aus Maus kodiert) suspendiert und in den Innenraum der

Versuchsanordnung überführt. Die Elektroporation der Zellen erfolgte dann unter Setzen von zwei Pulsen (1. Puls: 1000 V, 100  $\mu$ s; 2. Puls  $U_{\text{Anfang}} = 108$  V, 100 mC). Anschließend wurde die Zellsuspension wieder entnommen, in ein geeignetes Medium, beispielsweise RPMI-Medium, überführt und nach 20 Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> geerntet. Adhärenz CHO-Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 0,1 % Trypsin + 1 mM Ethylendiamintetraacetat in PBS abgelöst. Die Expression des H-2K<sup>k</sup> wurde durch Antikörperfärbung nachgewiesen (1:100 anti-H-2K<sup>k</sup> von Becton Dickinson + 1:50 Beriglobin von Aventis Behring in PBS, 10 Minuten bei Raumtemperatur). Die toten Zellen wurden mit 0,25  $\mu$ g/ml Propidiumjodid angefärbt. Die Analyse erfolgte in einem Durchfluss-Zytometer (FACScalibur, Becton Dickinson). Die Diagramme a) und b) zeigen, dass bei Verwendung von Elektroden mit dotiertem Kunststoff (PC/CF/Gr = Polycarbonat + 20 % Kohlefasern + 15 % Graphit und PEEK-CF = Polyetheretherketon + 40 % Kohlefasern) im Vergleich zur Verwendung von Aluminium-Elektroden zumindest vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Transfektionseffizienz erzielt werden können. Aufgrund der deutlich geringeren Mortalitätsraten bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Elektroden ergibt sich durch das günstigere Verhältnis von Transfektionseffizienz zu Mortalität sogar ein deutlicher Vorteil gegenüber der Verwendung von herkömmlichen Elektroden.

Figur 6 zeigt Diagramme einer durchfluss-zytometrischen Analyse transfizierter HL60-Zellen (Humane Lymphomzellen). Die Versuchsdurchführung und Versuchsbedingungen entsprechen den zu Figur 5 beschriebenen, mit der Ausnahme, dass die Spannungspulse bei der Elektroporation abgeändert wurden (hier: 1 Puls: 1000 V, 70  $\mu$ s; 2 Puls:  $U_{\text{Anfang}} = 81$  V, 22 mC). Auch hier konnten mit den verwendeten Elektroden aus dotiertem Kunststoff Ergebnisse erzielt werden, die denen bei Verwendung von Aluminium-Elektroden zumindest vergleichbar sind.

30

Figur 7 zeigt Diagramme einer durchfluss-zytometrischen Analyse transfizierter Jurkat-Zellen (Humane T-Zelllinie) bei Verwendung erfindungsgemäßer Elektroden bestehend aus Polyamid 66, welches mit 30 % Kohlefasern dotiert

wurde. Die Elektroporation wurde hier in 100 µl RPMI-Medium ohne Phenolrot mit 5 µg des Plasmids pEGFP-C1 durch ein Puls von 150 Volt und 5 µs gefolgt von einem Puls mit einer Anfangsspannung von 108 V und einer Ladung von 80 mC durchgeführt. Die Analyse erfolgte hierbei nach 4 Stunden. Auch bei diesem Beispiel konnte sowohl die Transfektionseffizienz als auch die Überlebensrate durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Behälter bzw. Elektroden aus dotiertem Kunststoff im Vergleich zu den herkömmlichen Aluminium-Elektroden deutlich erhöht werden. Die in den Figuren 5 bis 7 dargestellten Ergebnisse belegen also eindeutig, dass mit den erfindungsgemäßen Behältern die Transfektionseffizienzen bei der Elektroporation im Vergleich zu herkömmlichen Küvetten deutlich erhöht und die Mortalitätsrate deutlich gesenkt werden kann. Dies ist vor allem dadurch zu erklären, dass mit den erfindungsgemäßen Elektroden überraschenderweise vergleichbare Stromflüsse gewährleistet sind, während die bekannten Nachteile durch die Freisetzung von Metall-Ionen aus den Elektroden und somit toxische Einflüsse auf die Zellen vermieden werden.

Figur 8 zeigt Diagramme einer durchfluss-zytometrischen Analyse transfizierter HUVEC-Zellen (Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen) bei Verwendung von erfindungsgemäßen Elektroden aus Polyphenylensulfid mit 40 % Kohlefasern im Vergleich zu herkömmlichen Aluminium-Elektroden. Die Transfektion erfolgte in einem zellspezifischen Medium mit 5 µg/100µl Plasmid-DNA, wobei in diesem Fall zur Kompensation der geringfügig geringeren Leitfähigkeit des dotierten Kunststoffs unterschiedliche Spannungspulse gesetzt wurden (Puls für PPS/CF: 1000 V, 100 µs; Puls für Aluminium: 500 V, 100 µs). Die Zellen wurden nach 60 Stunden Inkubation durchfluss-zytometrisch auf Expression eines fluoreszierenden Proteins untersucht. Tote Zellen wurden auch hier mit 0,25 µg/ml Propidiumjodid angefärbt. Die Ergebnisse zeigen, dass die erfindungsgemäßen Behälter grundsätzlich auch für primäre menschliche Zellen geeignet sind. Dabei ist auch hier das Verhältnis von Transfektionseffizienz zu Mortalitätsrate günstiger als bei der Verwendung von herkömmlichen Aluminium-Elektroden. Dieser Effekt kann noch dadurch verstärkt werden, dass man die effektiv höheren Widerstände der dotierten

Kunststoffe durch eine Erhöhung der angelegten Spannung kompensiert. Auf diese Weise kann eine Anpassung der elektrischen Verhältnisse in der Zellsuspension bei Verwendung von Elektroden aus dotiertem Kunststoff erfolgen und die Transfektionseffizienz weiter gesteigert werden.

5

Figur 9 zeigt mikroskopische Aufnahmen von CHO-Zellkulturen jeweils 2 Tage nach einer Elektroporation mit Aluminium-Elektroden (a) und Elektroden aus Polyphenylensulfid mit 40 % Kohlefasern (b). Auch hier wurde die geringfügig geringere Leitfähigkeit der Elektroden aus dotiertem Kunststoff durch eine Erhöhung des ersten und zweiten Spannungspulses kompensiert (PPS/CF: 1000 V, 100  $\mu$ s und  $U_{\text{Anfang}} = 108$  V, 100 mC; Aluminium: 500 V, 100  $\mu$ s und  $U_{\text{Anfang}} = 76$  V, 60 mC). Bei der Verwendung von Aluminium-Elektroden zeigen sich deutlich sichtbare Präzipitate, von denen einige in a) durch eingefügte Pfeile gekennzeichnet sind. Diese Partikel legen sich auf die Zellen. Bei einer Verwendung von Elektroden aus dotiertem Kunststoff sind solche Partikel nicht nachweisbar, so dass sich durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Behälter ein Ausfallen von Präzipitaten offensichtlich vermeiden lässt. Dies wirkt sich zum einen positiv auf die Überlebensrate der Zellen und zum anderen vorteilhaft auf die weitere Handhabung der Zellen aus. Auch die medizinische Kompatibilität der Elektroporationsprodukte wird dadurch erhöht, so dass beispielsweise die mögliche Verwendung von transfizierten primären Zellen zur ex vivo – Gentherapie besonders vorteilhaft beeinflusst wird.

Die Figuren 10 und 11 zeigen jeweils Diagramme einer durchflusszytometrischen Analyse von Zellen (Figur 10: HUVEC-Zellen, Figur 11: CHO-Zellen), die jeweils in unterschiedlich behandelten Lösungen inkubiert wurden. Um die Auswirkung möglicher zellschädigender Bestandteile zu untersuchen, die aus den unterschiedlichen Elektroden aus dotiertem Kunststoff und aus Aluminium-Elektroden bei einer elektrischen Entladung frei werden könnten und über ihre unmittelbare Wirkung hinaus möglicherweise erst nach den Pulsen in der Zellkultur Wirkung zeigen, wurden die erfindungsgemäßen Behälter mit einfachen Pufferlösungen, beispielsweise PBS, ohne Zellen beladen und dreimal hintereinander einem starken Spannungspuls ausgesetzt (Aluminium:

500 V, 100  $\mu$ s und  $U_{\text{Anfang}} = 115$  V, 100 mC; dotierte Kunststoffe: 1000 V, 100  $\mu$ s und  $U_{\text{Anfang}} = 95$  V, 112 mC). Anschließend wurden 100  $\mu$ l der mittels der unterschiedlichen Elektroden gepulsten Lösungen zu 400  $\mu$ l Kulturmedium (EGM-2 BulletKit/Clonetics) gegeben und darin HUVEC-Zellen (18 Stunden - Werte:  $5 \cdot 10^4$  Zellen, 96 Stunden - Werte:  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen) bzw. CHO-Zellen (20 Stunden - Werte:  $10^5$  Zellen, 72 Stunden - Werte:  $2 \cdot 10^4$  Zellen) in 24-well-Platten ausgesät. Die Anzahl der toten bzw. lebenden Zellen wurde nach unterschiedlichen Zeiten und einer Inkubation bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  durchfluss-zytometrisch ermittelt. Nach Ablösen der Zellen durch 1  $\mu$ g/ml Trypsin in 1 mM Ethylendiamintheacetat in PBS und Vereinigung dieser Zellen mit dem Kulturüberstand wurde zur Ermittlung der toten Zellen 0,25  $\mu$ l/ml Propidiumjodid zugefügt. Zur Anfärbung der lebenden Zellen wurde 0,2  $\mu$ M Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimdylester (CFDA-SE) in PBS + 0,5 % Rinderserumalbumin zugegeben, und vor der durchfluss-zytometrischen Analyse für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die absolute Anzahl von Zellen in einem Ansatz zu ermitteln, wurde eine definierte Anzahl von Flow-Count Fluorosphere Beads (Beckman Coulter) zugefügt, die sich im FACS von den Zellen unterscheiden lassen. Auf diese Weise ließ sich die ermittelte Zellzahl auf das gesamte Volumen in der Zellkulturvertiefung extrapolieren. Die in den Figuren 10 und 11 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich bei der Verwendung von Elektroden aus dotiertem Kunststoff im Vergleich zu Aluminium-Elektroden ein leichter Vorteil ergibt. Insbesondere nach 4 Tagen sind die unter Verwendung von Kunststoff-Elektroden gepulsten Lösungen für das Überleben und Wachstum von CHO-Zellen günstiger. Bei HUVEC-Zellen kann man schon nach 24 Stunden einen positiven Effekt der verwendeten Kunststoffelettroden im Vergleich zu den herkömmlichen Aluminium-Elektroden erkennen. Diese Ergebnisse geben also einen Hinweis auf eine bessere Verträglichkeit von Elektroden aus dotiertem Kunststoff im Hinblick auf die Freisetzung zellschädigender Bestandteile, wobei hier die negativen Auswirkungen nach dem Stromfluss untersucht wurden. Durch die Verminderung der Freisetzung toxischer Metall-Ionen wird zusätzlich eine bessere biologische Kompatibilität der erfindungsgemäßen Behälter erreicht. Diese sind folglich vor allem im Hinblick auf eine weitere Verwendung der transfizierten Zellen,

beispielsweise eine Verwendung von veränderten primären Zellen zur ex vivo - Genterapie, deutlich gegenüber herkömmlichen Behältern bzw. Küvetten im Vorteil.

- 5 Figur 12 zeigt eine perspektivische Darstellung einer, möglichen Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Behälters. Der hier dargestellte Behälter 20 weist im wesentlichen die Form einer herkömmlichen Küvette auf. Der Behälter wird durch eine äußere Begrenzung 21 gebildet, welche ihrerseits einen Innenraum 22 bildet, der zur Aufnahme einer wässrigen Lösung dient. In  
10 der wässrigen Lösung können beispielsweise Zellen, Zellderivate, subzelluläre Partikel und/oder Vesikel suspendiert sein. Der Behälter kann beispielsweise zusätzlich zur wässrigen Lösung oder Suspension auch adhärente Zellen, Zellderivate, subzelluläre Partikel und/oder Vesikel enthalten. In zwei parallel und gegenüberliegend angeordneten Seitenwänden 23, 24 der äußeren  
15 Begrenzung 21 finden sich zwei gleichfalls parallele Elektroden 25, 26. Die beiden Elektroden 25, 26 bestehen aus einem Kunststoffmaterial, welches erfindungsgemäß mit zumindest einem leitfähigen Stoff dotiert ist. Bei der Dotierung kann es sich beispielsweise um Kohlefasern, Graphit, Ruß, Kunststoffnanotubes oder einen intrinsisch leitenden Kunststoff, oder aber auch  
20 um eine Kombination einer oder mehrerer dieser Stoffe handeln. Die äußere Begrenzung 21 besteht aus einem transparenten Kunststoffmaterial, dass elektrisch nicht-leitend ist. Der erfindungsgemäße Behälter 20 kann aufgrund der Spritzfähigkeit aller seiner Komponenten im 2-Komponenten-Spritzguß hergestellt werden. Dabei wurde im vorliegenden Fall zunächst die äußere  
25 Begrenzung 21 aus dem nicht-leitenden Kunststoff gespritzt. In die ausgesparten Fenster (nicht mehr sichtbar) wurde durch die Spritzkanäle 27, 28 der ebenfalls spritzfähige dotierte Kunststoff eingespritzt. Auf diese Weise ist eine äußerst einfache und kostengünstige Herstellung des erfindungsgemäßen Behälters 20 möglich. Ein solcher Behälter 20 in Küvettenform ist vor allem  
30 dann vorteilhaft, wenn dieser in einer herkömmlichen Elektroporationsapparatur verwendet werden soll. Je nach Art der Anwendung sind allerdings auch alle sonstigen denkbaren und sinnvollen Formen für einen erfindungsgemäßen Behälter möglich.

### Liste der verwendeten Abkürzungen:

Außer den im Duden gebräuchlichen; wurden folgende Abkürzungen  
5 verwendet:

	A	Ampere
	C	Coulomb
	CHO	chinese hamster ovary
10	cm	Zentimeter
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	Gew.-%	Gewichtsprozent
	HL-60	human lymphoma 60
	HUVEC	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen
15	kV	Kilovolt
	mC	Millicoulomb
	mM	Millimolar
	ms	Millisekunden
	PBS	Phosphat buffered Saline
20	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- Konzentration
	RNA	Ribonukleinsäure
	RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
	$\mu$ g	Mikrogramm
25	$\mu$ l	Mikroliter
	$\mu$ s	Mikrosekunden
	U	Spannung
	$U_{\text{Anfang}}$	Anfangsspannung
	V	Volt

30

**Bezugszeichenliste:**

	1	Versuchsanordnung
5	2	Abstandhalterplatte
	3	Elektrode
	4	Elektrode
	5	Ausschnitt
	6	Kupferplatte
10	7	Kupferplatte
	8	Gewindeabschnitt
	9	Gewindeabschnitt
	10	Innenraum
	11	Innenkanten
15	12	Versuchsanordnung
	13	Kupferdraht
	14	Kupferdraht
	20	Behälter
	21	äußere Begrenzung
20	22	Innenraum
	23	Seitenwand
	24	Seitenwand
	25	Elektrode
	26	Elektrode
25	27	Spritzkanal
	28	Spritzkanal



Anmelder: amaxa GmbH, Köln  
Vertreter: Patentanwalt Dr. Alvaro Remus  
Titel: Behälter mit mindestens einer Elektrode

### Patentansprüche

1. Behälter (20) zur Aufnahme einer wässrigen Lösung, und insbesondere von Zellen, Zellerivaten, subzellulären Partikeln und/oder Vesikeln, welcher zumindest teilweise von einer äußeren Begrenzung gebildet ist, die einen Innenraum zur Aufnahme der Lösung bildet, und welcher mindestens einen Bereich aufweist, der beim Anlegen einer elektrischen Spannung und einer anschließenden Entladung als Elektrode dient, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens eine Elektrode (25, 26) aus einem leitfähigen Kunststoffmaterial besteht, das zumindest auf einem Kunststoff basiert, der mit mindestens einem leitfähigen Stoff dotiert ist.
2. Behälter nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Dotierung aus Kohlefasern, Graphit, Ruß, Kohlenstoffnanotubes und/oder einem intrinsisch leitenden Kunststoff besteht.
3. Behälter nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Dotierung in dem Kunststoff in einer Konzentration von insgesamt 10 – 80 Gew.-%, vorzugsweise 20 – 60 Gew.-%, vorliegt.
4. Behälter nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Kunststoff Polycarbonat, Polyetheretherketon, Polypropylen, Polyamid, Polyphenylensulfid oder ein Gemisch dieser Polymere ist oder zumindest auf einem oder mehreren dieser Polymere basiert und/oder dass der Kunststoff ein intrinsisch leitender Kunststoff ist.
5. Behälter nach Anspruch 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass der intrinsisch leitende Kunststoff ein Polyanilin, Polyacetylen, Poly-para-phenylen, Poly-para-phenylensulfid, Polypyrrol, Polythiophen, Polypropylen oder ähnliches ist oder zumindest auf einem oder mehreren dieser Polymere basiert.

6. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die äußere Begrenzung (21) aus Kunststoff, bevorzugt transparentem Kunststoff, gebildet ist.
- 5 7. Behälter nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die äußere Begrenzung (21) aus dem gleichen Kunststoff besteht, auf dem auch die zumindest eine Elektrode (25, 26) basiert.
- 10 8. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die zumindest eine Elektrode (25, 26) in die äußere Begrenzung (21) integriert ist.
- 15 9. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass dieser zumindest zwei Elektroden (25, 26) aufweist, die aus dem gleichen Material bestehen.
- 20 10. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest zwei Elektroden (25, 26) aus unterschiedlichen Materialien bestehen.
- 25 11. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Elektrode (25, 26) aus mit 15 - 40 Gew.-%, vorzugsweise 20 Gew.-%, Kohlefasern und 1 - 40 Gew.-%, vorzugsweise 15 Gew.-%, Graphit dotiertem Polycarbonat besteht.
- 30 12. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Elektrode (25, 26) aus mit 30 - 50 Gew.-%, vorzugsweise 40 Gew.-%, Kohlefasern dotiertem Polyetheretherketon besteht.
13. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Elektrode (25, 26) aus mit 20 - 40 Gew.-%,

vorzugsweise 30 Gew.-%, Kohlefasern dotiertem Polyamid, vorzugsweise Polyamid 66, besteht.

- 5 14. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Elektrode (25, 26) aus mit 15 - 40 Gew.-%, vorzugsweise 20 Gew.-%, Kohlefasern dotiertem Polypropylen besteht.
- 10 15. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Elektrode (25, 26) aus mit 30 - 50 Gew.-%, vorzugsweise 40 Gew.-%, Kohlefasern dotiertem Polyphenylensulfid besteht.
- 15 16. Behälteranordnung bestehend aus wenigstens zwei, vorzugsweise 6, 12, 24, 48, 96 oder mehr Behältern nach einem der Ansprüche 1 bis 15, die zu einer Einheit verbunden sind.
- 20 17. Verfahren zur Herstellung der Behälter oder Behälteranordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter (20) oder die Behälteranordnung im 2-Komponenten-Spritzguss hergestellt wird, wobei zunächst die äußere Begrenzung (21) mit mindestens einem ausgesparten Fenster gespritzt wird und anschließend zumindest in das mindestens eine Fenster das leitfähigen Kunststoffmaterial aus dotiertem Kunststoff eingespritzt wird, oder wobei zunächst die mindestens eine Elektrode (25, 26) aus dem dotierten Kunststoff gespritzt wird und anschließend um die mindestens eine Elektrode (25, 26) herum die äußere Begrenzung (21) gespritzt wird.
- 25 18. Verfahren zur Behandlung von Zellen, Zellderivaten, subzellulären Partikeln und/oder Vesikeln mit elektrischem Strom, insbesondere zur Elektroporation oder Elektrofusion, umfassend:
- 30 a) Überführen der Zellen, Zellderivate, subzellulären Partikel und/oder Vesikel in den Innenraum zumindest eines Behälters (20) nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder zumindest eines Behälters einer

Behälteranordnung nach Anspruch 16, wobei der Behälter (20) mindestens eine Elektrode (25, 26) aus dem dotierten Kunststoff aufweist, sowie zumindest eine weitere Elektrode (25, 26) vorgesehen ist, und

- 5 b) Anlegen einer elektrischen Spannung an die Elektroden (25, 26) und Erzeugung eines Stromflusses im Innenraum (22) des Behälters (20).

10 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass der elektrische Strom eine Stromdichte von bis zu  $120 \text{ A/cm}^2$ , vorzugsweise  $80 \text{ A/cm}^2$ , erreicht.

15 20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, wobei biologisch aktive Moleküle, insbesondere Nukleinsäuren, in der Lösung gelöst sind und durch einen Spannungspuls mit einer Feldstärke von  $2 \text{ bis } 10 \text{ kV*cm}^{-1}$  und einer Dauer von  $10 \text{ bis } 200 \text{ } \mu\text{s}$  ein Einbringen dieser biologisch aktiven Moleküle in lebende Zellen erreicht wird.

20 21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Einbringen der biologisch aktiven Moleküle in die Zellen durch einen auf den Spannungspuls ohne Unterbrechung folgenden Stromfluss mit einer Stromdichte von  $2 \text{ bis } 14 \text{ A/cm}^2$ , vorzugsweise  $5 \text{ A/cm}^2$ , und einer Dauer von  $1 \text{ bis } 100 \text{ ms}$ , vorzugsweise  $50 \text{ ms}$ , erreicht wird.

Fig. 1

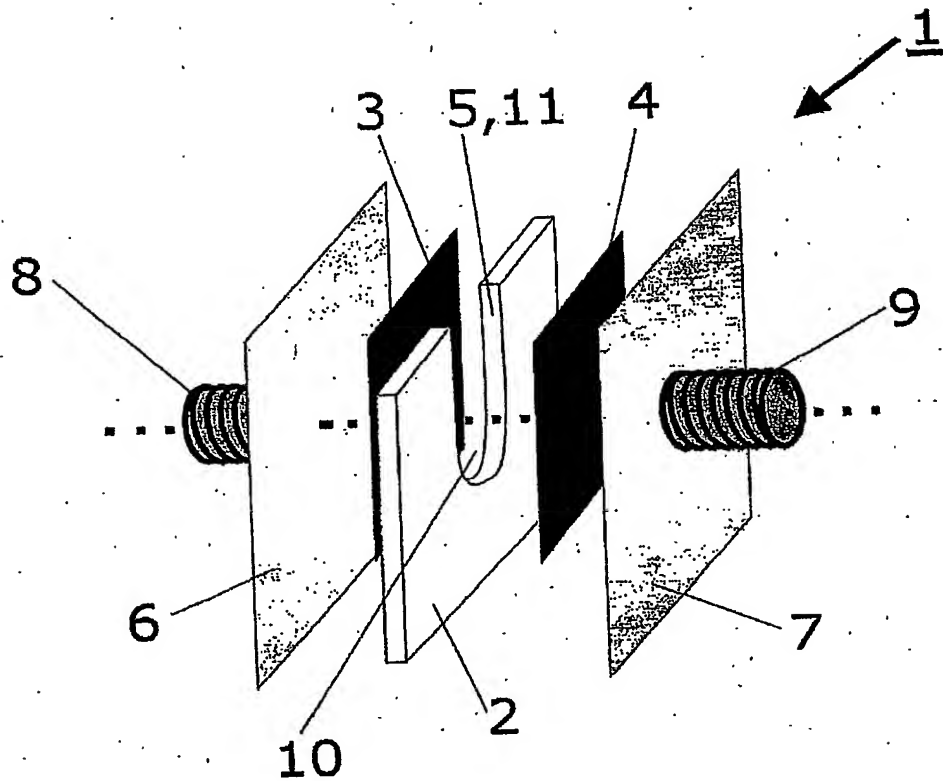
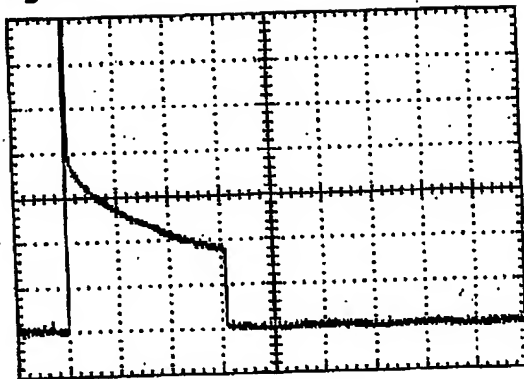
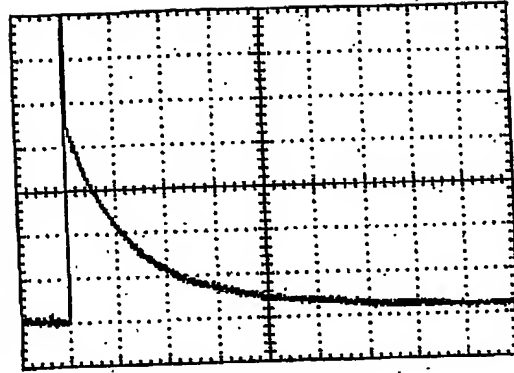


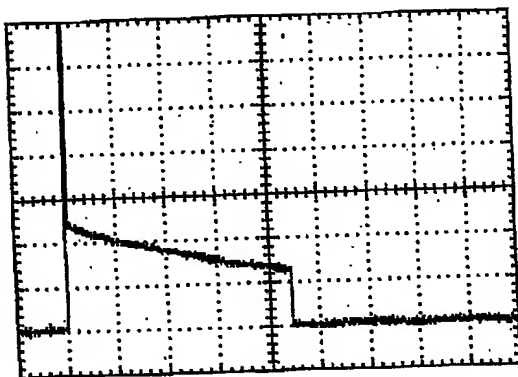
Fig. 2



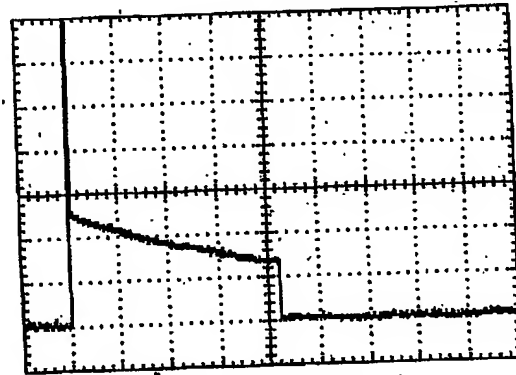
a) Aluminium/Lösung A



b) Aluminium/Lösung B



c) PC+CF+Gr/Lösung A



d) PC+CF+Gr /Lösung B

Fig. 3

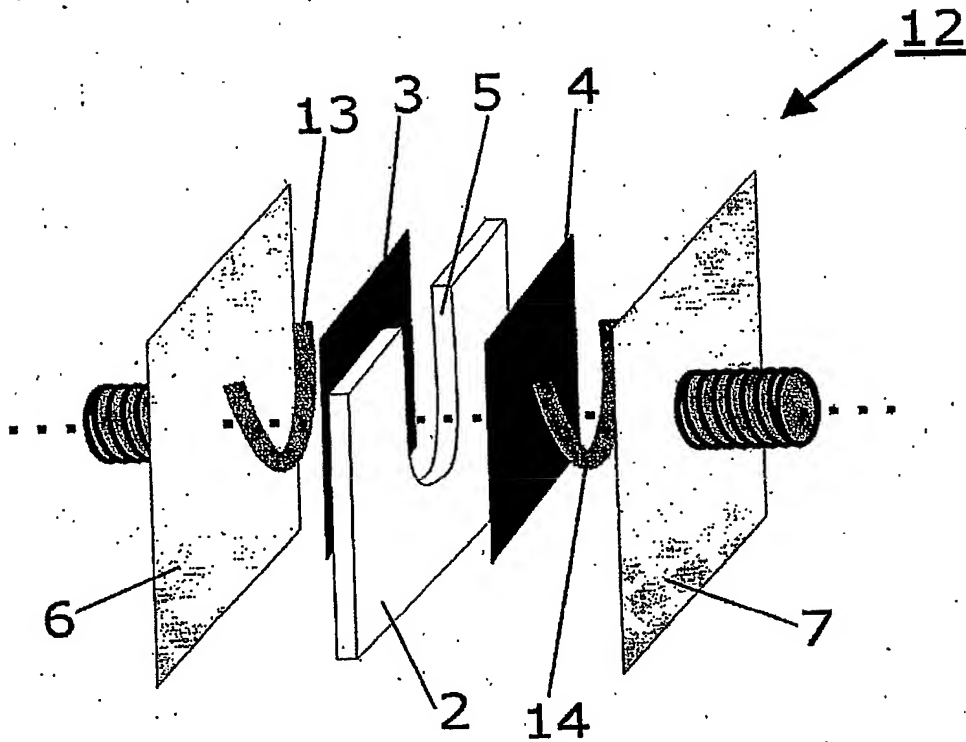
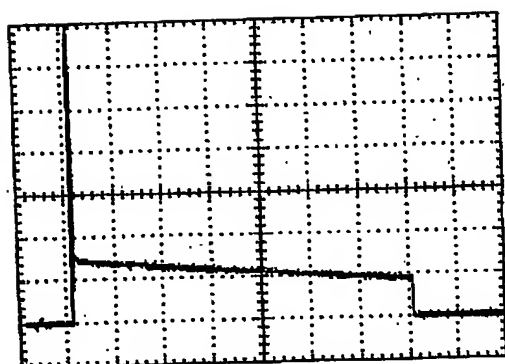
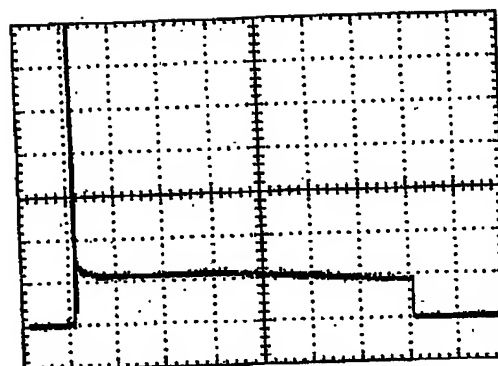


Fig. 4



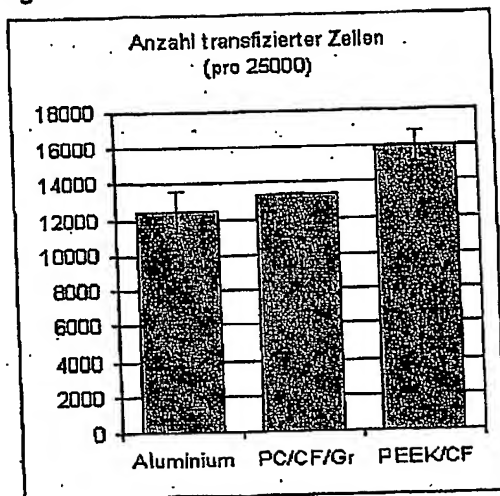
a)



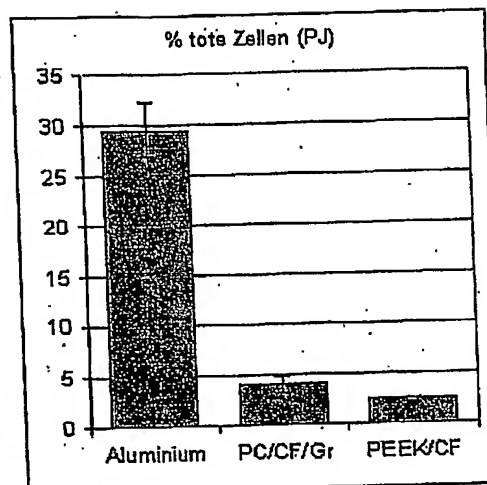
b)



Fig. 5

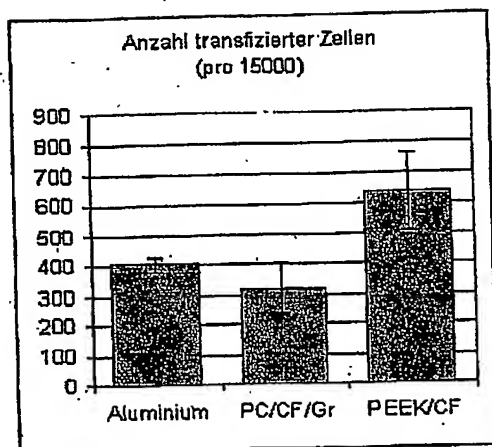


a)

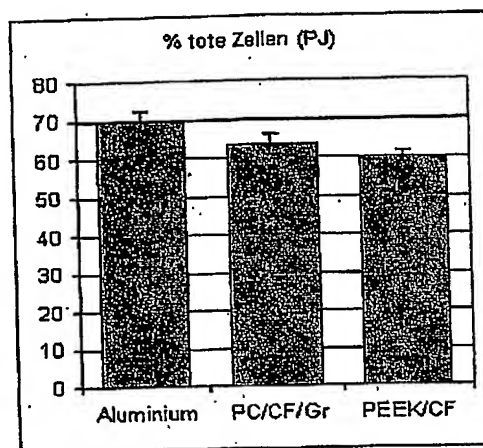


b)

**Fig. 6**

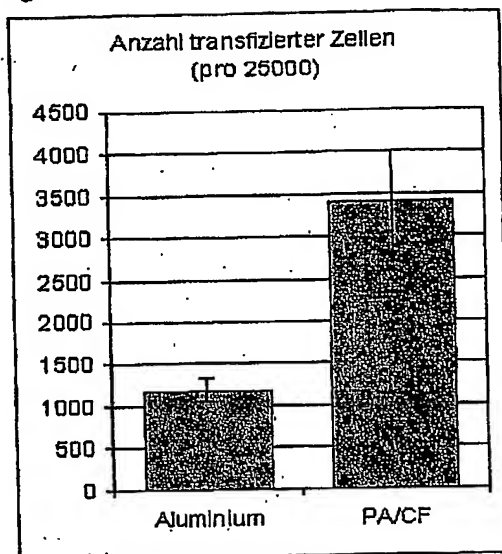


a)

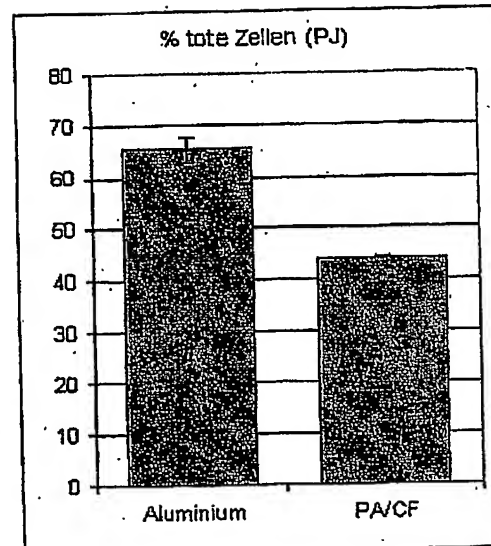


b)

Fig. 7

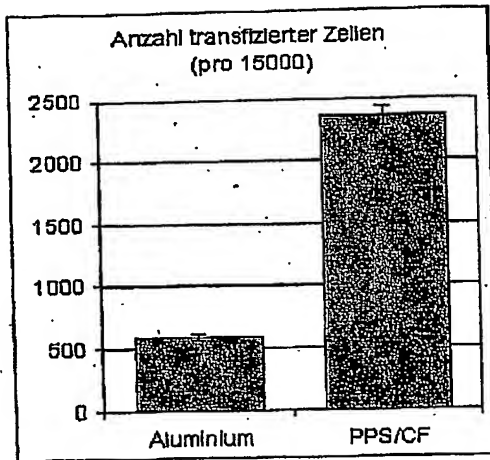


a)

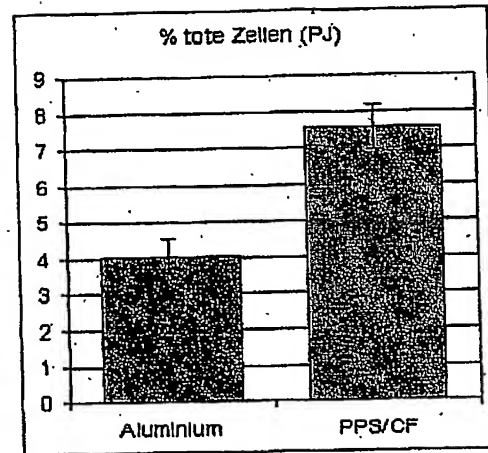


b)

Fig. 8

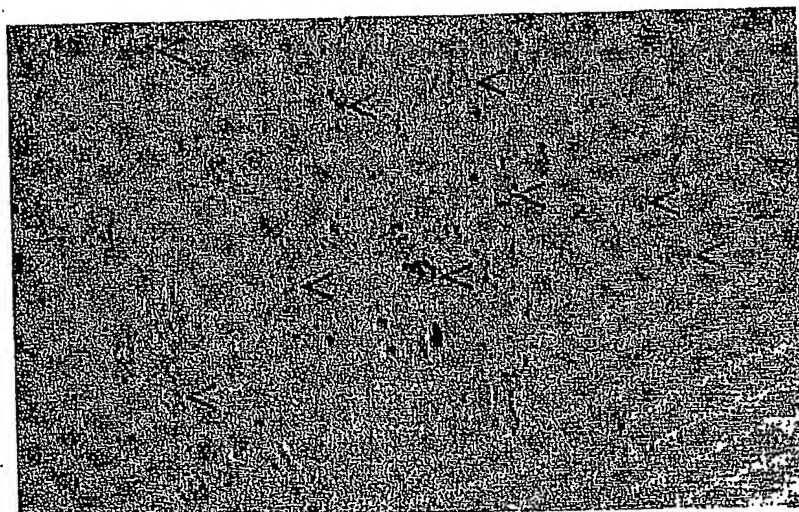


a)

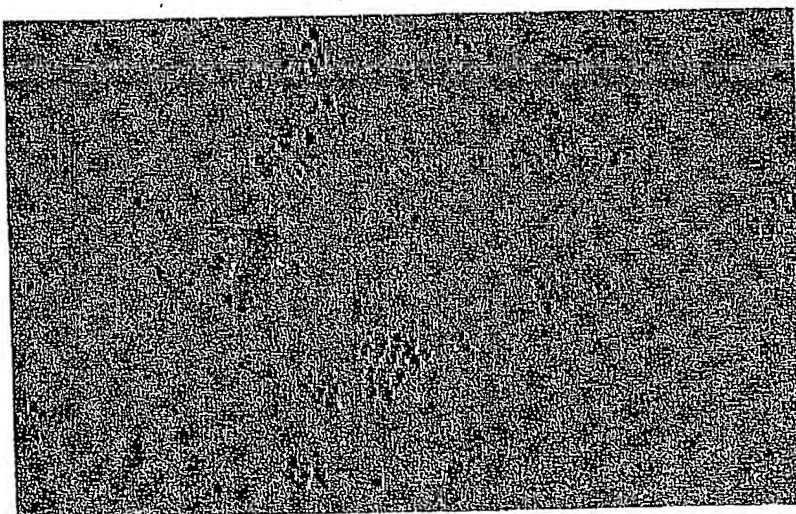


b)

Fig. 9

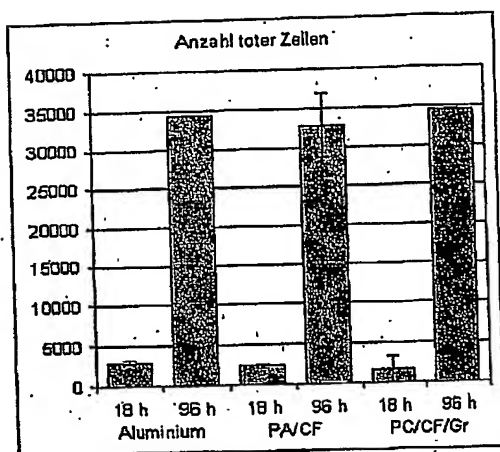


a)

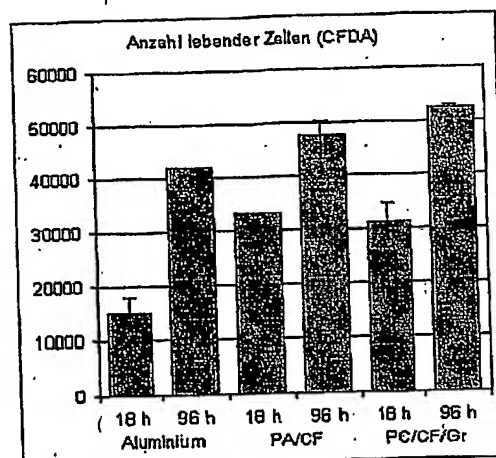


b)

Fig. 10

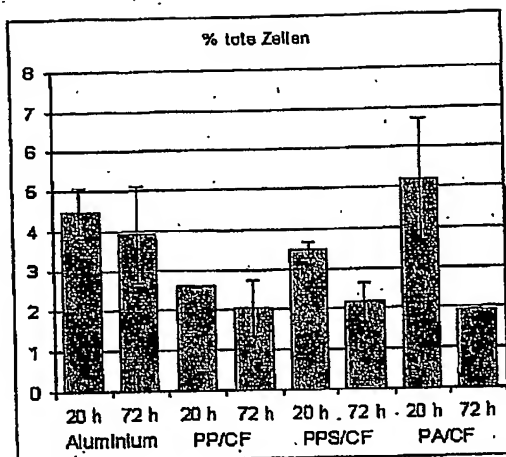


a)

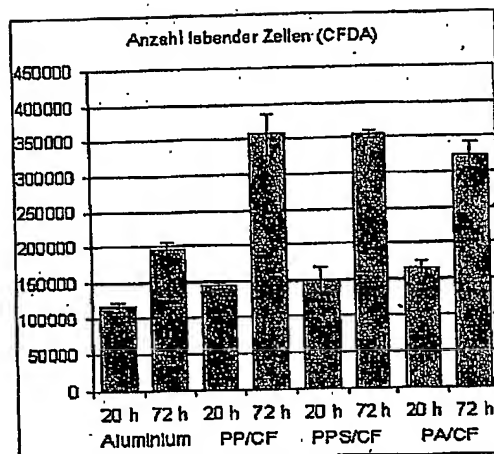


b)

Fig. 11

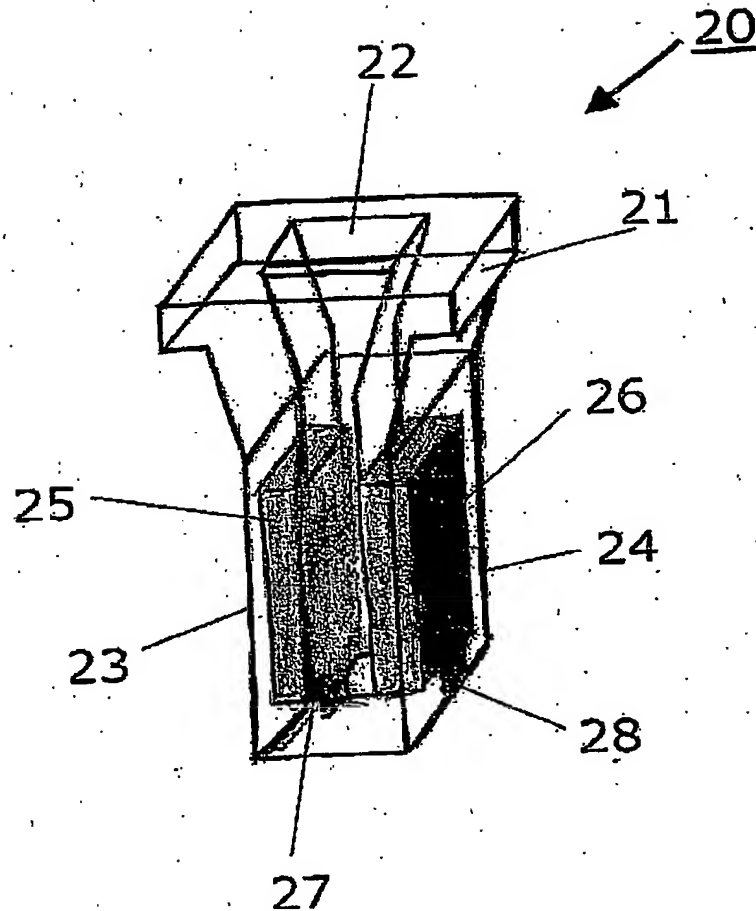


a)



b)

Fig. 12





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**